

## Localización de receptores de progesterona isoforma A en útero de cerdas no gestantes y placenta materna durante la gestación temprana

M. d. C. Viglierchio<sup>1</sup>, S. I. Williams<sup>2</sup>, M. G. García<sup>1</sup>, D. V. Lacolla<sup>1,3</sup>, V. N. Murcia<sup>1</sup> y G. N. Yaful<sup>1,3</sup>

Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Pampa.

Calle 5 y 116, General Pico. La Pampa. Argentina.

Recibido Agosto 03, 2013. Aceptado Mayo 15, 2014.

---

## Localization of progesterone receptor isoform A in the uterus of non-pregnant sows and maternal placenta during early gestation

**Abstract.** The progesterone (P<sub>4</sub>) produced by the corpus luteum, plays a vital role in the preparation, reception of embryos and maintenance of pregnancy. Its effects are mediated by the interaction with its specific intracellular receptors. The aim of this study was to investigate the localization of the progesterone receptor isoform A (PRA) in histological endometrial samples from crossbred pregnant and non pregnant sows, and the relationship with plasma P<sub>4</sub> levels. Nonpregnant sows in follicular phase and pregnant sows at days 5, 17 and 35 of gestation (n=16) were used. The localization of the PRA was determined by immunohistochemistry with monoclonal antibodies. In endometrium of nonpregnant and pregnant sows at day 5 of gestation PRA expression was observed in the nuclei of epithelium cells, uterine glands, stroma and myometrium. While on day 17 of gestation PRA expression was found in glands, stroma and myometrium, and on day 35 the expression was observed in the stroma and myometrium. An increase in serum P<sub>4</sub> concentrations was found on day 17 of gestation. The localization and variations in the score for PRA in different cell types may reflect a cell specific influence of progesterone, which might be explained by increasing P<sub>4</sub> levels during the «window of implantation».

**Key Words:** Early pregnancy, Pigs, Placenta, Progesterone receptor

---

**Resumen.** La progesterona (P<sub>4</sub>) producida por el cuerpo lúteo regula la diferenciación y función del endometrio manteniendo la gestación. La hormona interactúa con su receptor, el cual se expresa como dos isoformas, con acciones diferentes. Este estudio investigó la localización de la isoforma A (RPA) en cortes histológicos de útero de cerdas no gestantes y placenta materna de cerdas gestantes y su relación con la concentración de P<sub>4</sub> en sangre. Se utilizaron cerdas mestizas no gestantes en fase folicular y gestantes de 5, 17 y 35 d (n=16). Se determinó la localización de RPA por inmunohistoquímica usando anticuerpos monoclonales. En las cerdas no gestantes y en cerdas de 5 d de gestación, se observó la expresión de RPA en núcleos de epitelio, glándulas uterinas, estroma y miometrio. A los 17 d de gestación hubo expresión en glándulas, estroma y miometrio, y a los 35 d en estroma y miometrio. Hubo aumento de la concentración de P<sub>4</sub> en sangre a los 17 d de gestación, coincidente con una desaparición de ciertas localizaciones de los RPA. Se concluye que la localización de los RPA varía con la edad gestacional y que su desaparición «temporal» puede coincidir con la «ventana de implantación» y el aumento de las concentraciones de P<sub>4</sub>.

**Palabras clave:** Gestación temprana, Placenta, Porcinos, Receptores de progesterona

---

<sup>1</sup>Autor para la correspondencia, e-mail: [vigliorchiomarita@yahoo.com.ar](mailto:vigliorchiomarita@yahoo.com.ar)

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. La Plata. Buenos Aires. Argentina.

<sup>3</sup>Escuela de Veterinaria, Universidad Nacional de Río Negro. Choele Choel. Río Negro, Argentina.

## Introducción

En la mayoría de las especies mamíferas la presencia de la progesterona ( $P_4$ ) es crítica en todos los estadios de la preñez, incluyendo fertilización, implantación, decidualización y mantenimiento de la gestación. La  $P_4$  prepara al útero para la implantación y el mantenimiento de la preñez, aumentando la actividad secretora de las glándulas del endometrio e inhibiendo la motilidad del miometrio (Hafez y Hafez, 2002) por alteración de la permeabilidad iónica de los músculos del miometrio, provocando la disminución de la excitabilidad de la célula.

La  $P_4$  ejerce sus efectos sobre los tejidos blanco, primariamente, vía el receptor nuclear de la progesterona (RP). Además, el efecto fisiológico está mediado por dos receptores intracelulares de la progesterona RP-A y RP-B (Mulac-Jericevic y Conneely, 2004).

En la cerda, la  $P_4$  es producida y secretada por el cuerpo lúteo (CL), siendo esencial para el mantenimiento de la gestación (Spencer y Bazer, 2004). El crecimiento del conceptus y su implantación no sólo están regulados por la secreción de progesterona por el CL sino también por la expresión de receptores de progesterona en el epitelio y el estroma uterino (Geisert *et al.*, 2006).

Algunos estudios mencionan que los RP no se detectan en el epitelio luminal entre los días 12 a 18 de gestación (Okulicz *et al.*, 1998) ni al día 6 durante el período de blastocisto (Ying *et al.*, 2000). Algunos autores (Geisert *et al.*, 2006) proponen que el crecimiento del conceptus y la implantación uterina están temporalmente asociados con la desaparición de los RP en el epitelio uterino; la propia  $P_4$  inhibiría la expresión de sus receptores mediante la activación del factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B). Según otros autores (Sukjumlong *et al.*, 2005), los RP también se localizan por inmunohistoquímica en el núcleo de todos los tipos celulares del útero durante las diferentes fases del ciclo estral y en epitelio uterino en la gestación temprana (Yafu, 2009).

En todos los mamíferos la  $P_4$  y los RP son indispensables para habilitar los cambios que se producen en el útero durante el ciclo estral y la preñez. El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de los receptores para  $P_4$  isoforma A, en úteros de cerdas no gestantes y en placenta materna durante la gestación temprana y su relación con la concentración de  $P_4$  en sangre.

## Materiales y Métodos

### Animales

Se utilizaron cerdas mestizas no gestantes en fase folicular ( $n = 4$ ) y cerdas gestantes de 5 ( $n = 4$ ), 17 ( $n = 4$ ) y 35 d ( $n = 4$ ), provenientes de la zona de General Pico, La Pampa, Argentina.

**Sueros porcinos.** Se extrajo sangre por corte de la vena yugular. Una vez extraída la sangre, la misma fue puesta en un baño termostatzado ( $37^\circ\text{C}$ ) para lograr una adecuada retracción del coágulo. Luego el suero se clarificó por centrifugación a 500 g durante 10 min, se fraccionó en alícuotas y se conservó a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su uso.

**Tractos reproductivos.** El tracto reproductivo completo de las cerdas fue removido inmediatamente después del sacrificio del animal y lavado con solución salina de Hank (SSH; Gibco; Koncurat *et al.*, 1999).

### Determinación de $P_4$ en suero

Se realizó por Inmunoensayo Enzimático Quimioluminiscente en fase sólida, en un equipo DPC (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA).

**Determinación de receptores de progesterona isoforma A en cortes histológicos.** Las muestras fueron fijadas en formol amortiguado e incluidas en

parafina. La inmunomarcación de los RPA se realizó a través de inmunohistoquímica mediante la técnica de inmunoperoxidasa indirecta. Se incubaron con un anticuerpo monoclonal de ratón (NCL PGR 312: RP-A clone 16 Novocastra, Newcastle, UK), dilución 1:100, toda la noche a  $4^\circ\text{C}$ . Se revelaron con LSAB (Labeled Streptavidin Biotin Method) utilizando DAB (diaminobencidina, Dako). Se contrastaron con hematoxilina, luego se deshidrataron y se montaron.

### Análisis de los resultados

Las imágenes de los preparados histológicos generadas con un microscopio Primo Star Carl Zeiss, fueron digitalizadas mediante una cámara Canon G10 PowerShot, de 14.4 megapíxeles, conectada a una computadora. La evaluación de los preparados histológicos fue realizada con el analizador digital de imágenes Image Pro-Plus 3.0.

### Análisis estadístico

El análisis estadístico para el estudio de las variables concentración de progesterona en suero y porcentaje de área inmunomarcada en las muestras de tejidos provenientes de diferentes períodos gestacionales y de cerdas no gestantes, fue de tipo descriptivo. Los preparados de inmunohistoquímica para RPA se evaluaron usando la herramienta de

segmentación de colores; se midió el área total positivamente coloreada con DAB (producto de reacción marrón moderado/intenso) y se expresó

como el porcentaje del área total positivamente marcado. Los valores se expresaron como el promedio + la desviación estándar (DE).

## Resultados

La concentración de  $P_4$  sérica (ng/mL) en cerdas no gestantes en fase folicular fue inferior ( $0.56 \pm 0.25$ , CV = 44.4%) a la de las cerdas gestantes. Las cerdas de 5 d de gestación tuvieron menor concentración de  $P_4$  sérica ( $26.65 \pm 4.10$ , CV = 15.4%) que las cerdas con gestaciones de 17 d ( $70.65 \pm 3.30$ , CV = 51.3%) y 35 d ( $30.9 \pm 5.47$ , CV = 17.8%), observándose una mayor concentración de  $P_4$  en las cerdas en fase de «ventana de implantación» (Figura 1).

El porcentaje de área inmunomarcada de la expresión (IHCSA) de los RPA fue en epitelio  $28.82 \pm 14.13$  (CV = 49%), estroma  $1.39 \pm 0.27$  (CV = 19.4%) y glándulas uterinas  $36.18 \pm 11.8$  (CV = 32.61%;

Figura 2) de cerdas no gestantes en fase folicular. A los 5 d de gestación el porcentaje de IHCSA fue en epitelio  $59.11 \pm 5.32$  (CV=9%), en estroma  $6.92 \pm 2.24$  (CV 32.3%) y en glándulas uterinas  $66.37 \pm 3.48$  (CV= 5.2%; Figura 3). En tanto, en la placenta de las cerdas de 17 d de gestación el porcentaje de IHCSA fue  $1.51 \pm 0.3$  (CV = 19.9%) en estroma y  $75.26 \pm 2.25$  (CV = 2.98%; Figura 4) en glándulas uterinas. Con respecto a las cerdas de 35 d de gestación, el porcentaje de IHCSA fue  $0.31 \pm 0.15$  (CV = 48%; Figura 5) en estroma. Los núcleos de las células del miometrio, en todos los estadíos, se consideran controles positivos de inmunomarcación para la isoforma A del RP.

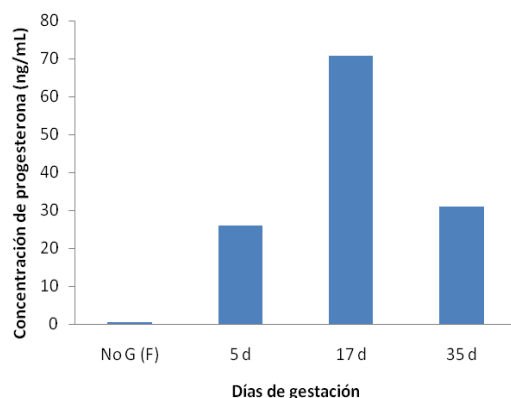


Figura 1. Concentración de P en suero de cerdas no gestantes y gestantes, obteniendo por quimioluminiscencia.

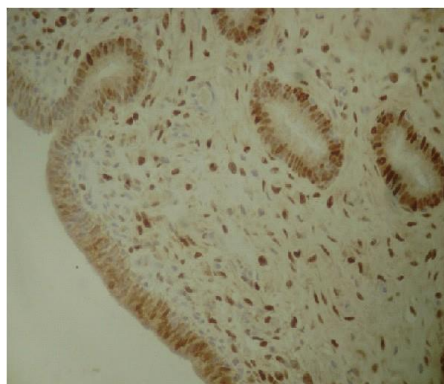


Figura 2. Microfotografía de útero de cerda no gestante, donde se observa marcación de RPA en núcleos de las células epiteliales, estroma y glándulas uterinas 40x.

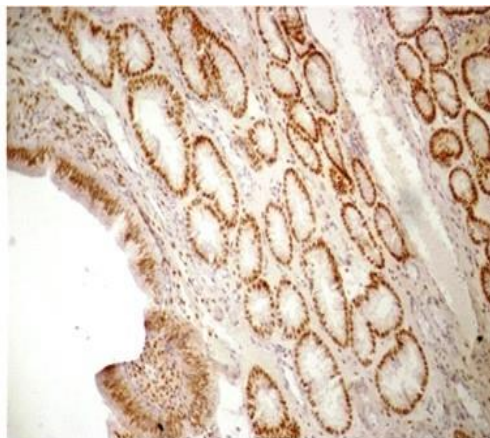


Figura 3. Microfotografía de placenta materna de cerdas de 5 d de gestación, donde se observa marcación de RPA en núcleos de las células epiteliales, estroma y glándulas uterinas 10x.

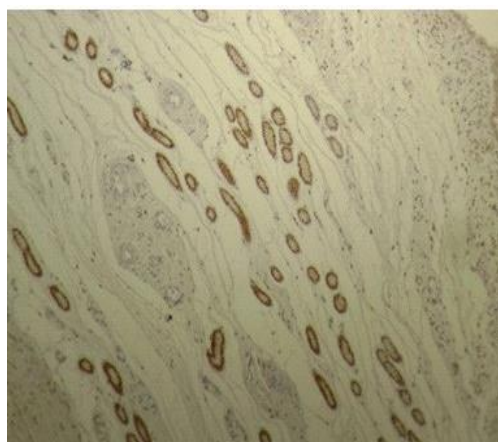


Figura 4. Microfotografía de placenta materna de cerdas de 17 d de gestación donde se observa marcación de RPA en núcleos de las células del estroma y glándulas uterinas 10x.

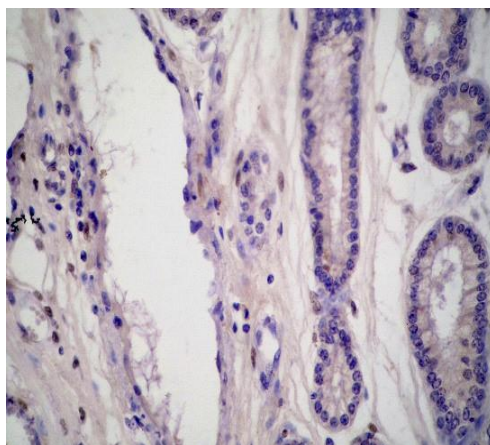


Figura 5. Microfotografía de placenta materna de cerdas de 35 d de gestación, donde se observa marcación de RPA en núcleos de las células estroma 40x.

## Discusión

La  $P_4$ , considerada la hormona de la preñez en la mayoría de los mamíferos, ejerce su acción a través de receptores y en la cerda es el CL el que mantiene la producción de esta hormona durante la gestación. En los presentes datos la concentración sérica de  $P_4$  aumenta a medida que progresa la gestación, con un pico máximo a los 17 d, para luego descender, coincidiendo con Yaful (2009), quien reportó que las mayores concentraciones se encontraron entre los 15 a 20 d de preñez o período de la «ventana de implantación». Muchos autores han observado desaparición temporaria de los RP del epitelio uterino en la fase de ventana de implantación (Okulicz *et al.*, 1998; Geisert *et al.*, 2006), resultado con el que coincidimos, considerando la expresión sólo de la isoforma A en cerdas de 17 d de gestación, cuando observamos marcación nuclear en las células del estroma, de las glándulas y del miometrio. En tanto, también concordamos con Sukjumlong *et al.* (2005), quienes detectaron RP en los núcleos de todos los tipos celulares en las diferentes fases del ciclo estral, puesto que hallamos expresión nuclear de RPA en células epiteliales, del estroma, de las glándulas y del miometrio en cerdas no gestantes en

fase folicular. En cambio, Yaful (2009) no detecta RP en glándulas uterinas pero sí en epitelio de cerdas no gestantes, además observa marcación en epitelio uterino a los 15 d de gestación y un aumento de expresión a los 35 d de la misma en glándulas uterinas, resultado que no pudimos registrar. En todos estos trabajos el anticuerpo utilizado para revelar la presencia del RP, no diferenció entre RPA y RPB, los cuales poseen efectos fisiológicos diferentes (Mulac-Jericevic y Conneely, 2004).

En todos los mamíferos la  $P_4$  y los RP (A y B) son imprescindibles para habilitar los cambios que se producen en el útero durante el ciclo estral y la preñez. Los efectos de la hormona y sus receptores deben ser comprendidos en el contexto de cambios temporales y espaciales, que regulan las funciones de proliferación y/o diferenciación del epitelio endometrial a través de factores parácrinos. La expresión nuclear de la isoforma A en los diferentes tipos celulares del útero o de la placenta materna, varía con la edad gestacional y su desaparición «temporal» puede coincidir con la ventana de implantación y el aumento de las concentraciones séricas de  $P_4$ .

## Literatura Citada

- Geisert, R. D., J. W. Ross, M. D. Ashworth, F. J. White, G. A. Johnson, and U. de Silva. 2006. Maternal recognition of pregnancy signal or endocrine disruptor: the two faces of oestrogen during establishment of pregnancy in the pig. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 62: 131.
- Hafez, E. S. E y B. Hafez 2002. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. (4.<sup>a</sup> Ed.). Editorial McGraw Hill, México D.F. XIII. p. 519.
- Koncurat, M., C. Greco y A. Vivas. 1999. Hallazgo del factor precoz de preñez (EPF) en extractos placentarios porcinos. *Rev. Brasil. Reprod. Anim.* 3:193.
- Mulac-Jericevic, B. and O. M. Conneely. 2004. Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors. *Reproduction.* 128: 139.
- Okulicz, W. C., S. Hild-Petito and B. Chilton. 1998. Expression of steroid hormone receptor in the pregnant uterus. *Endocrinol. Pregnancy.* 4: 177.
- Spencer, T. E. and F. W. Bazer. 2004. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2: 49.
- Sukjumlong, S., A. M. Dalin, L. Sahlin and E. Persson. 2005. Immunohistochemical studies on the progesterone receptor (PR) in the sow uterus during the oestrous cycle and in inseminated sows at oestrus and early pregnancy. *Reproduction.* 129: 349.
- Yaful, G. N. 2009. Estudio de la Placenta Porcina: Concentración de Hormonas Esteroides y Parámetros de Eficiencia Reproductiva [tesis doctoral]. Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Bs As. p. 73.
- Ying, C.W., W.L. Hsu, W.F. Hong, W.T.K. Cheng and Y.C. Yang. 2000. Estrogen receptor is expressed in pig embryos during preimplantation development. *Mol. Reprod. Develop.* 55: 83.